Induction neurale chez les Oiseaux. Rapport temporel entre la neurulation du blastoderme-hôte et l'apparition de l'ébauche neurale induite par un fragment de la ligne primitive[1]

par

J. GALLERA

Laboratoire d'Embryologie expérimentale, Institut d'Anatomie, Université de Genève

(Avec 6 figures)

INTRODUCTION

Déjà au cours des premiers travaux concernant l'induction neurale chez les Amphibiens, on s'aperçut que l'ébauche neurale secondaire ne peut apparaître pas avant la formation de la plaque neurale de l'embryon-hôte (MANGOLD 1926 et 1929, MANGOLD et SPEMANN 1927). Si l'embryon-hôte est suffisamment jeune, le moment de la manifestation de l'action inductrice ne dépend ni du moment où la greffe a été faite ni de l'âge du greffon. Cependant, l'ectoblaste d'une jeune neurula n'est plus compétent, c'est-à-dire il n'est plus capable de réagir au stimulus inducteur. Il s'avère donc que la formation d'une ébauche neurale est fonction à la fois de l'action inductrice et de la maturation progressive du feuillet externe. Cette dernière semble être dans une large mesure autonome. En effet, les expériences de HOLTFRETER (1938), de GALLERA (1952) et de LEIKOLA (1963) ont démontré que l'ectoblaste prélevé sur une très jeune gastrula et cultivé ensuite *in vitro*, hors de l'organisme embryonnaire, perd ses compétences en même temps que le feuillet externe d'un embryon intact.

[1] Travail subventionné par le Fonds national suisse de la Recherche scientifique.

La simultanéité de l'apparition de l'ébauche neurale induite par le greffon et du système nerveux de l'hôte ne signifie pourtant pas que l'âge de l'embryon-hôte au moment de la greffe ne joue aucun rôle. Les recherches de JOHNEN (1956-1961, 1964) faites sur des Amphibiens et celles de GALLERA et IVANOV (1964) effectuées sur les embryons de Poulet ont révélé que l'induction de la mœlle exige plus de temps que celle du cerveau. Par conséquent, les greffes faites tardivement ne peuvent induire que le cerveau. D'autre part, les greffons implantés vers la fin de la période de compétence n'induisent que des structures neurales rudimentaires et souvent incapables de poursuivre leur développement.

Chez les Oiseaux, de même que chez les Amphibiens, la simultanéité de l'apparition de l'ébauche neurale induite et celle de l'hôte est couramment admise, bien que ce phénomène n'ait jamais été, à notre connaissance, soumis à une analyse expérimentale méthodique. Or, une telle analyse devient d'autant plus urgente que récemment VAKAET (1964) a pu montrer que le segment moyen d'une ligne primitive jeune est capable d'induire la formation d'une nouvelle ligne primitive, laquelle n'apparaît pourtant que beaucoup plus tard, quand le corps embryonnaire de l'hôte est déjà en voie de formation. Nous assistons donc dans ce cas à un décalage considérable entre le stade du développement atteint par l'embryon-hôte et celui des structures induites. Malheureusement, VAKAET n'a pas étudié systématiquement le développement ultérieur des lignes primitives induites. Néanmoins, il a mentionné que sporadiquement elles peuvent donner naissance à une ébauche neurale.

MATÉRIEL ET MÉTHODE

Les opérations sont effectuées sur des blastodermes de Poulet cultivés *in vitro* selon une variante de la méthode de NEW (1955) couramment employée dans notre laboratoire.

Dans la première série d'expériences, le greffon de forme pentagonale ($0{,}4 \times 0{,}6$ mm) et contenant la partie antérieure de la ligne primitive achevée est transplanté sur un blastoderme plus jeune (ligne primitive moyenne à longue) dont le feuillet externe garde encore toute sa compétence neurogène. Le greffon est placé dans une niche pratiquée dans le rempart vitellin en avant du croissant antérieur de Duval. Il est appliqué sa face ventrale contre l'ectoblaste de l'hôte et orienté de telle façon que son bord antérieur est tourné vers l'extrémité céphalique de la ligne primitive de l'hôte.

Nous suivons de près le développement des blastodermes opérés, pour noter à quel moment apparaît l'ébauche neurale induite. La formation du repli cérébral transverse nous sert de critérium de la neurulation. Certains embryons sont fixés à ce stade, les autres sont incubés jusqu'au moment où le corps embryonnaire de l'hôte est déjà pourvu de quelques paires de somites.

Dans la deuxième série d'expériences, deux greffons sont implantés sur le même blastoderme, mais ils sont greffés à des stades différents. Le deuxième greffon est implanté 5 à 8 heures après le premier. Au moment de la première greffe, le blastoderme-hôte est pourvu d'une ligne primitive courte ou moyenne. Le deuxième greffon est implanté au moment où l'hôte atteint le stade de la ligne primitive longue ou achevée. Les greffons sont les mêmes que ceux employés dans la série précédente. Nous plaçons le premier greffon dans une loge faite dans le rempart vitellin en avant et à gauche du croissant antérieur de Duval, tandis que le deuxième greffon est implanté à droite. Les bords antérieurs des deux greffons sont orientés vers le nœud de Hensen de la ligne primitive de l'hôte.

Pour la troisième série de nos expériences, les blastodermes au stade de la ligne primitive moyenne nous servent de donneurs. Le greffon de forme carrée (0,4 mm de côté) est prélevé à mi-hauteur de la ligne primitive. Après son excision, il est transplanté sur un autre blastoderme où il est mis dans une niche découpée dans le rempart vitellin en avant du croissant antérieur de Duval. Comme d'habitude, le bord antérieur du greffon est tourné vers la ligne primitive de l'hôte. Ce dernier est, selon le cas, au stade de la ligne primitive courte, moyenne ou longue. Nos blastodermes sont examinés à de courts intervalles sous la loupe binoculaire et fixés quand le corps embryonnaire de l'hôte est bien constitué et pourvu de plusieurs paires de somites. Tous nos blastodermes sont fixés au Bouin, examinés sur des coupes sériées et colorés à l'hémalun-érythrosine.

RÉSULTATS EXPÉRIMENTAUX

La première série de nos expériences contient 14 blastodermes. Dans 4 cas la greffe a eu lieu au stade de la ligne primitive moyenne, tandis que dans les dix cas suivants le greffon a été implanté sur des blastodermes munis d'une ligne primitive longue. Tous les greffons ont induit la formation d'un cerveau qui se continue parfois dans une ébauche médullaire rudimentaire. Dans tous les cas, le repli cérébral transverse, limitant la plaque cérébrale induite, est apparu en même temps que celui de l'embryon-hôte.

Nos greffons ont été prélevés sur des embryons plus âgés que les blastodermes-hôtes. Par conséquent, la différenciation des structures axiales fournies par les greffons (chorde, somites, endoblaste pharyngien, plaquette neurale) est nettement en avance aussi bien sur celle des embryons-hôtes que sur celle des ébauches neurales induites par nos greffons. Par exemple, dans le cas des blastodermes fixés tout au début de la formation du repli cérébral transverse, les greffons ont déjà donné naissance à quelques somites bien développés.

La deuxième série d'expériences englobe 23 blastodermes. Tous portent deux greffons dont le second a été implanté 5 à 8 heures après le premier. Dans 5 cas,

le premier greffon a été mis sur le blastoderme muni d'une ligne primitive courte et la deuxième greffe a eu lieu au moment où l'embryon-hôte a atteint le stade de la ligne primitive longue. Tous ces greffons ont déclenché des inductions neurales typiques qui deviennent visibles au moment de la neurulation de l'embryon-hôte. Toutefois, l'ébauche neurale induite par le second greffon était en général un peu plus petite que celle due au premier (voir, fig. 1).

Dans 18 cas, le premier greffon a été implanté sur des blastodermes au stade de la ligne primitive moyenne. La deuxième greffe a été pratiquée au moment où la ligne primitive de l'hôte a atteint son développement maximum. A ce stade (ligne primitive achevée) la compétence neurogène de l'ectoblaste commence déjà à disparaître. En effet, nos premiers greffons ont provoqué dans tous les cas la formation d'une ébauche neurale qui est devenue visible au même moment que celle de l'embryon-hôte, tandis que 5 de nos greffons implantés tardivement n'ont pas pu accomplir leur rôle d'inducteur neurogène. Ils n'ont provoqué qu'un léger épaississement de l'ectoblaste sus-jacent, lequel peut tout au plus prendre l'aspect d'un neurectoblaste jeune et cela seulement sur une étendue très restreinte. L'un de ces cas est illustré par nos figures 2 et 3. Sur la première nous voyons une coupe oblique du cerveau induit par le premier greffon, tandis que la fig. 3 reproduit une coupe du même blastoderme, mais pratiquée au niveau du deuxième greffon. Dans tous les autres cas le deuxième greffon a pu encore induire une ébauche neurale rudimentaire, en général mal conformée et souvent arrêtée dans son développement. Notons encore que cette ébauche s'est toujours constituée avec un certain retard de 2 à 4 heures par rapport au moment de la neurulation de l'embryon-hôte et de la formation de l'ébauche neurale induite par le premier greffon.

La troisième série de nos expériences a pour but de voir si l'induction d'une nouvelle ligne primitive dans l'ectoblaste périphérique d'un blastoderme en pleine gastrulation est capable de retarder la perte de sa compétence neurogène. Le tiers moyen d'une ligne primitive, qui a atteint environ la moitié de sa longueur définitive, nous sert d'inducteur. Comme Nicolet (1967) l'a récemment démontré, cette partie de la ligne primitive ne contient que de l'endoblaste présomptif. En effet, les contours de nos greffons s'effacent peu de temps après leur implantation. Le matériel greffé s'étale sur la face ventrale du blastoderme et, en écartant les cellules du rempart vitellin, forme une mince couche d'endoblaste du même caractère que celui de l'aire pellucide. L'ectoblaste sus-jacent s'épaissit légèrement et nous assistons à la formation d'une nouvelle aire pellucide. Toutefois, elle est toujours moins étendue que celle du blastoderme-hôte. Un peu plus tard, dans 12 cas sur 15, une nouvelle ligne primitive s'est constituée au sein de l'aire pellucide secondaire. De même que cette dernière, elle était toujours de taille réduite ou même rudimentaire, surtout dans les cas où la greffe a eu lieu au stade de la ligne primitive longue. Dans deux cas, l'apparition de cette ligne primitive n'était

qu'éphémère, après avoir fourni un peu de mésoblaste indifférencié, elle s'est effacée presque entièrement. En revanche, les autres lignes primitives induites par nos greffons ont donné naissance à un embryon secondaire, mais toujours plus petit et plus jeune que l'embryon-hôte (fig. 4). Le retard du développement et en particulier de la neurulation de ces embryons secondaires dépend de l'âge du blastoderme-hôte au moment de la greffe. Dans un cas où cette dernière a été faite tout au début de la formation de la ligne primitive, le développement des deux embryons, primaire et secondaire, était presque synchrone. Six greffons ont été implantés sur des blastodermes au stade de la ligne primitive moyenne et alors le repli cérébral transverse de l'embryon secondaire est apparu 5 à 8 heures après le début de la neurulation de l'embryon-hôte. Dans les trois cas où le greffon mis sur des blastodermes au stade de la ligne primitive longue a encore pu susciter la formation d'une nouvelle ligne primitive et d'un corps embryonnaire secondaire, la neurulation de ce dernier a été retardée de 10 à 13 heures, c'est-à-dire elle a eu lieu au moment où l'embryon-hôte était déjà pourvu de 10 paires de somites. La figure 5 représente le cas où le décalage entre la neurulation des deux embryons a atteint 13 heures. Le blastoderme en question a été fixé tout au début de la neurulation de l'embryon secondaire. L'examen des coupes sériées a montré que la plaque neurale induite a été déjà limitée en avant par le repli cérébral transverse en voie de formation. Cependant, ce repli n'est pas visible sur la microphotographie reproduite sur notre figure. En effet, la tête de l'embryon-hôte surplombe déjà le blastoderme et le bord antérieur de la plaque neurale secondaire.

Il nous reste encore à mentionner les trois blastodermes chez lesquels le greffon n'a pas induit la formation d'une nouvelle ligne primitive. Dans un cas le greffon n'a suscité que la formation d'une petite aire pellucide dont l'ectoblaste prend l'aspect du neurectoblaste jeune. Chez les deux blastodermes, le greffon a donné naissance à un intestin céphalique et a induit la formation d'un cerveau (fig. 6) aussi développé que celui de l'embryon-hôte.

DISCUSSION

Dans un travail antérieur (Gallera et Ivanov 1964), nous avons démontré que chez les Oiseaux l'ectoblaste n'est compétent que pendant une période relativement courte. Les greffes du nœud de Hensen pratiquées tout au début de la chordulation ne sont plus capables de déclencher des inductions neurales. La compétence neurogène de l'ectoblaste diminue très progressivement durant la croissance de la ligne primitive pour disparaître rapidement quand cette dernière a atteint sa longueur maximale. Les greffons nodaux transplantés à des stades successifs de la constitution de la ligne primitive induisent la formation de structures neurales dont le degré de développement coïncide avec celui atteint par l'ébauche neu-

rale de l'embryon-hôte. Toutefois, nous n'avions pas suivi le développement de nos blastodermes de suffisamment près pour pouvoir affirmer que l'apparition des deux ébauches neurales, l'une induite par le greffon et l'autre formée par l'embryon-hôte, était rigoureusement simultanée. Les expériences relatées dans le travail présent (série I et II) prouvent qu'effectivement tel est le cas, au moins si la greffe n'a pas été faite trop tardivement, vers la fin de la période où l'ectoblaste est encore compétent. En effet, la formation des ébauches neurales induites par nos greffons implantés tardivement semblait être légèrement retardée. Dans ce cas pourtant, les inductions obtenues ont été toujours rudimentaires. Il est donc possible, qu'à l'examen in toto nous n'ayons pas pu apercevoir les tous premiers stades de la formation de ces ébauches neurales réduites et plus ou moins atypiques. Nous pouvons donc admettre que l'action inductrice neurogène exercée sur le feuillet externe ne modifie aucunement le cours de l'évolution de ses compétences.

Dans un autre travail (Gallera 1965), les greffons nodaux avaient été détachés de l'ectoblaste de l'hôte après un laps de temps déterminé et de plus en plus long. Il s'est avéré qu'un contact de 8 heures entre le greffon et l'ectoblaste de l'aire opaque est amplement suffisant pour déclencher des inductions neurales. Cependant, l'ectoblaste soumis à l'action inductrice interrompue au moment opportun ne se transforme en plaque neurale qu'au moment de la neurulation de l'embryon-hôte. Il appert donc que les effets de l'action inductrice peuvent demeurer latents pendant une période plus ou moins longue. Ils ne peuvent se manifester qu'au moment où le feuillet externe atteint un degré déterminé de maturation. Remarquons encore que nous avons toujours placé nos greffons dans la région du blastoderme le plus à l'abri des modifications progressives qui ont leur centre dans l'aire pellucide. En effet, le mésoblaste périphérique ne pénètre que très tardivement dans la région antérieure de l'aire opaque. Force est donc d'admettre que les cellules embryonnaires ne peuvent jamais rester dans un état stationnaire, elles évoluent intrinsèquement et le rythme de ce processus ne peut pas être modifié par l'action inductrice neurogène. En revanche, comme la troisième série de nos expériences présentes l'a démontré, l'induction d'un nouveau foyer gastruléen peut retarder considérablement (jusqu'à 13 heures) le moment où l'ectoblaste perd sa compétence neurogène. Toutefois, la possibilité d'un tel « rajeunissement » est strictement limitée dans le temps. Le tiers moyen de la ligne primitive jeune, implanté au stade de la ligne primitive courte à longue, induit toujours la formation d'une nouvelle ligne primitive dans l'ectoblaste sus-jacent. Cette ligne évolue normalement et donne naissance à un corps embryonnaire qui se constitue beaucoup plus tard que celui de l'embryon-hôte. Par contre, le même greffon transplanté sur un blastoderme un peu plus âgé induit ou bien une ligne primitive abortive ou bien la formation d'une ébauche cérébrale qui apparaît alors au même moment que celle de l'embryon-hôte.

Résumé

Le nœud de Hensen induit toujours des ébauches neurales, lorsqu'il est implanté dans l'aire opaque de blastodermes de Poulet à différents stades de la formation de la ligne primitive. Le système nerveux induit et celui de l'embryon-hôte se forment alors en même temps, quel que soit le stade d'implantation. En revanche, si nous utilisons la partie moyenne de la ligne primitive jeune comme greffon, elle déclenche la formation d'une nouvelle ligne primitive. Elle donne souvent un corps embryonnaire secondaire, dont l'ébauche neurale peut apparaître beaucoup plus tard que celle de l'embryon-hôte.

Par conséquent, nous pouvons conclure que l'induction neurogène ne modifie ni l'évolution des compétences de l'ectoblaste, ni la durée nécessaire à sa maturation, mais que l'induction d'une nouvelle ligne primitive peut au contraire retarder considérablement le moment de la perte de la compétence neurogène dans l'ectoblaste qui l'environne.

Summary

The Hensen's node always induces neural structures, when it is transplanted into the area opaca of chick blastoderms at different stages of the primitive streak formation. In these conditions, the induced neural anlage and that of the host embryo are formed in the same time, whatever the stage of implantation is. At the contrary, if we use the middle part of the young primitive streak as a graft, it elicits the formation of a new primitive streak. It can often give birth to a secondary embryonic body, the neural anlage of which may appear much later than that of the host embryo.

Therefore, we can conclude that the neural induction alters neither the evolution of the ectoblast competences nor the time required for its maturation, but, at the contrary, the induction of a new primitive streak may delay considerably the moment, at which the neural competence is lost, in the neighbouring ectoblast.

Zusammenfassung

Die Primitivknote induziert immer neurale Anlagen, wenn sie in der Area paca von Hühnchen Keimscheiben an verschiedenen Stadien der Primitivstreienentwicklung verpflanzt wird. Dann bilden der induzierte Nervensystem und erjenige des Wirtkeimes sich gleichzeitig, welche auch die Verpflanzungstadium ein mag. Im Gegenteil, wenn wir einen Mittelteil des jungen Primitivstreifens nplantierten, löst er die Bildung eines neuen Primitivstreifens aus. Es bildet oft

einen sekundären Embryonalkörper, dessen neurale Anlage viel später als diejenige des Wirtembryones erscheinen kann.

Daran, können wir beschliessen, dass die Neuralinduktion weder die Ektoblastkompetenzentwicklung noch seine Reifendauer verändern, sondern die Induktion eines neuen Primitivstreifens der Neuralkompetenzverlustmoment im umgebenden Ektoblast lange aufschieben kann.

BIBLIOGRAPHIE

GALLERA, J. 1952. *Inductions céphaliques dans l'ectoblaste vieillissant (Triturus alpestris)* Arch. Entwickl.-Mech. Org. 146: 21-67.

— 1965. *Quelle est la durée nécessaire pour déclencher des inductions neurales chez le Poulet?* Experientia 21: 218.

— et I. IVANOV. 1964. *La compétence neurogène du feuillet externe du blastoderme de poulet en fonction du facteur « temps ».* J. Embryol. exp. Morph. 12: 693-711.

HOLTFRETER, J. 1938. *Veränderungen der Reaktionsweise im alterenden isolierten Gastrulaektoderm.* Arch. Entwickl.-Mech. Org. 138: 163-196.

JOHNEN, A. G. 1956. *Experimental studies about the temporal relationships in the induction process. I Experiments on Amblystoma mexicanum.* Proc. Acad. Sci. Amst. Ser. C 59: 554-561.

— 1956. *Experimental studies about the temporal relationships in the induction process. II Experiments on Triturus vulgaris.* Proc. Acad. Sci. Amst. Ser. C 59: 652-660.

— 1961. *Experimentelle Untersuchungen uber die Bedeutung des Zeitfaktors beim Vorgang der neuralen Induktion.* Arch. Entwickl-Mech. Org. 153: 1-13.

— 1964. *Experimentelle Untersuchungen über die Bedeutung des Zeitfaktors beim Vorgang der neuralen Induktion II.* Arch. Entwickl.-Mech. Org. 155: 302-313.

— 1964. *Heteroplastische Explantatkombinationen bei Amblystoma und Triturus zur Analyse der primären Schritte bei neuralen Induktion.* Arch. Entwickl.-Mech. Org. 155: 314-391.

LEIKOLA, A. 1963. *The mesodermal and neural competence of isolated gastrula ectoderm studied by heterogenous inductors. Ann.* Zool. Soc. « Vanamo » 25: 1-50.

MANGOLD, O. 1926. *Ueber formative Reize in der Entwicklung der Amphibien.* Naturwiss. 14: 1169-1175.

— 1929. *Experimente zur Analyse der Determination und Induktion der Medullarplatte.* Arch. Entwickl.-Mech. Org. 117: 587-696.

MANGOLD, O. und H. SPEMANN. 1927. *Ueber Induktion von Medullarplatte durch Medullarplatte im jüngeren Keim, ein Beispiel homöogenetischer oder assimilatorischer Induktion.* Arch. Entwickl.-Mech. Org. 111: 342-422.

NEW, D. 1955. *A new technique for the cultivation of the Chick embryo in vitro.* J. Embryol exp. Morph. 3: 326-331.

NICOLET, G. 1967. *La chronologie d'invagination chez le Poulet : Etude à l'aide de la thymidine tritiée.* Experientia 23: 576.

VAKAET, L. 1964. *Diversité fonctionnelle de la ligne primitive du blastoderme de Poulet* C. R. Soc. Biol. 158: 1964.